

【調査研究】

Rapid Determination System of Viral RNA Sequence ver.3.1の検出感度の改善 Improvement of Detection Sensitivity in Rapid Determination System of Viral RNA Sequence ver.3.1

木田浩司, 谷川徳行, 松岡保博, 磯田美穂子, 梶原香代子, 濱野雅子 (ウイルス科)

Kouji Kida, Noriyuki Tanikawa, Yasuhiro Matsuoka, Mihoko Isoda, Kayoko Kajihara, Masako Hamano
(Virology section)

要 旨

感染症発生動向調査事業において、上気道炎患者の咽頭拭い液からVeroE6細胞を用いて分離された未同定ウイルス2株について、RDV法 (Rapid Determination System of Viral RNA Sequence) ver.3.1による同定を試みたが、ウイルスゲノムは検出できなかった。そこで、本法の改良を目的として、エコーウイルス9型Hill株を用い、前処理工程及びRNA抽出工程における検出感度への影響を検証した。その結果、前処理工程のヌクレアーゼ処理によってウイルスゲノムが分解された可能性は否定された。また、RNA抽出工程においてキャリアRNAを添加することでウイルスゲノムの抽出効率が大きく改善し、その成績は原法で使用されるAgilent Total RNA isolation mini kitよりもQIAamp Viral RNA mini kitの方が優れていた。そこで、未同定ウイルス2株について、後者を用いたRDV法ver.3.1を実施したところ、1株はパラインフルエンザウイルス3型であることが確認された。同定できなかった1株については、同時に多数検出されたマイコプラズマの菌体及びゲノムを除去するため、前処理工程の前に遠心処理工程、さらにRNA抽出工程の後にDNase I処理工程を加え、再度RDV法ver.3.1を実施したところ、ヒトメタニューモウイルスであることが確認された。

[キーワード：RDV法, エコーウイルス, パラインフルエンザウイルス, ヒトメタニューモウイルス]

[Key words : Rapid Determination System of Viral RNA Sequence, Echovirus, Parainfluenza virus, Human Metapneumovirus]

1 はじめに

感染症発生動向調査事業 (以下「発生動向調査」という。)では、複数の株化細胞を用いることにより、多種多様な病原性ウイルスが分離される。これまで、これらの分離ウイルスの同定には、生物学的手法である中和試験、赤血球凝集試験等、また生化学的手法である蛍光抗体法、ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 等が用いられてきたが、近年では分子生物学的手法、特にPCR法が主流になってきている。PCR法は迅速性・特異性に優れた検査法であるが、それぞれのウイルスに特異的な塩基配列のプライマーが必要となる。そのため、ウイルス種が予測できない場合、検出系の選択自体が困難となる。また、一般にウイルスゲノム、とりわけRNAウイルスのゲノムは変異確率が高く、プライマー配列とのミスマッチにより、既存の検査系では検出できないウイルス株が生じることがある。

これらの未知ウイルス又は変異ウイルスを同定するため、これまでに様々な分子生物学的手法が開発されてきた。なかでも、遺伝子クローニングによる同定は、最も一般的に用いられてきた方法である。しかし、平成16年

に「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」が施行され、未同定ウイルスの遺伝子クローニングには文部科学大臣の確認が必要となった。また近年は、次世代シーケンサーにより、新種ウイルス等のゲノム解析が盛んに行われているが、機器、ランニングコストともに未だ高価なうえ、高度なデータ解析技術を要求される。そのため、これらの手法は、ほとんどの地方衛生研究所で導入できていないのが実情である。このような状況のなか、2007年、水谷らによって、未知のRNAウイルスのゲノムを短時間で検出・同定する網羅的遺伝子検出法であるRDV法 (Rapid Determination System of Viral RNA Sequence) が開発された¹⁾。RDV法は、遺伝子組換え生物や特別な機器を必要とせず、約3日でRNAウイルスの培養上清からのゲノム解析を可能とする画期的な方法であり、目的に応じて、様々なバージョンが開発されている^{2) 3) 4) 5)}。また、DNAウイルスに対応したRDV-D法も開発されている⁶⁾。

今回我々は、Watanabeらの報告したRDV法ver.3.1⁵⁾を導入し、発生動向調査で検出された未同定のウイルス2株について解析を行ったが、ウイルスゲノムは検出できな

かった。そこで、RDV法ver.3.1の工程を検証し、若干の操作を加えたところ、これらの同定に成功したので報告する。

2 材料と方法

2.1 ウイルス

2.1.1 未同定ウイルス

発生動向調査で採取した上気道炎を呈する患者の咽頭拭い液をVeroE6細胞に接種し、7.5μg/mLとなるようトリプシンを加えた無血清Eagle's Minimum Essential Medium (以下「E-MEM」という。)で培養して分離されたウイルス2株の培養上清を供試検体とした(以下「ウイルスA及びウイルスB」という。)

2.1.2 エコーウイルス9型Hill株

エコーウイルス9型(以下「E9」という。)Hill株をヒト羊膜由来株化細胞のFL細胞に接種し、2%ウシ胎児血清加E-MEMで培養し、その上清を供試検体とした。

2.2 RDV法ver.3.1 (原法)

RDV法ver.3.1の概略を図1に示した。今回はWatanabe

らの方法⁵⁾を基本とし、2次ライブラリー作成に用いる制限酵素をSau3AIからBfuCIに変更⁷⁾して実施した。2次ライブラリー用アダプター及びプライマー並びにシーケンス用プライマーの塩基配列を表1に示した。方法を要約すると、次のとおりである。

- ① 前処理:ウイルス培養上清88μLに対し、ヌクレアーゼ(DNAse I及びRNAse A)処理を行い、上清中の不要な核酸を除去した。
- ② RNA抽出:Agilent Total RNA isolation mini kit (Agilent Technology社製)を用いてウイルスゲノムRNAをnuclease free water 20μLに抽出した。
- ③ 逆転写反応:抽出したRNA 8μLを用いてSuperscript III (ThermoFisher scientific社製)とRNase Hを組み合わせ、2本鎖cDNAを合成した。
- ④ 1次ライブラリー:2本鎖cDNAをnuclease free waterで3倍希釈し、その10μLを用いてWhole Genome Amplification kit (Sigma Aldrich社製)により、DNAのフラグメンテーションとキット付属のアダプター付加を行った。次にAmplitaq Gold LD (ThermoFisher scientific社製)を用いて遺伝子増幅

表1 アダプター及びプライマー

使用目的	名称	塩基配列	塩基長
2次ライブラリー用 アダプター	RDV-Adaptor-BfuCI	5'-TGTCACGACTGAACCGAAC-3'	20
		5'-P-GATCGTTCGGTTCAGTCGTGGAC-3'	23
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAA-3'	21
		5'-P-CGTTTCGTAAGGGTATGCTCTCCGT-3'	24
2次ライブラリー 増幅用プライマー	RDV-Adaptor-BfuCI-1	5'-TGTCACGACTGAACCGAACGATCA-3'	25
	RDV-Adaptor-BfuCI-2	5'-TGTCACGACTGAACCGAACGATCT-3'	25
	RDV-Adaptor-BfuCI-3	5'-TGTCACGACTGAACCGAACGATCG-3'	25
	RDV-Adaptor-BfuCI-4	5'-TGTCACGACTGAACCGAACGATCC-3'	25
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV-1	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTAA-3'	26
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV-2	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTAT-3'	26
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV-3	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTAG-3'	26
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV-4	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTAC-3'	26
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV-5	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTTA-3'	26
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV-6	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTTT-3'	26
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV-7	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTTG-3'	26
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV-8	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTTTC-3'	26
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV-9	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTGA-3'	26
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV-10	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTGT-3'	26
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV-11	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTGG-3'	26
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV-12	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTGC-3'	26
RDV-Adaptor-HpyCH4IV-13	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTCA-3'	26	
RDV-Adaptor-HpyCH4IV-14	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTCT-3'	26	
RDV-Adaptor-HpyCH4IV-15	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTCCG-3'	26	
RDV-Adaptor-HpyCH4IV-16	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGTCC-3'	26	
シーケンス用 プライマー	RDV-Adaptor-BfuCI for Sequence	5'-TGTCACGACTGAACCGAACGATC-3'	24
	RDV-Adaptor-HpyCH4IV for Sequence	5'-CGGAGAGCATACCCTTACGAACGT-3'	24

を行い、1次ライブラリーを作成した。

- ⑤ 2次ライブラリー：PCR産物精製キットである MonoFas（ジールサイエンス社製）を用いて増幅DNAを精製し、BfuCI及びHpyCH4IVによる消化後、アダプターを付加し、Amplitaq Gold PCR Master mix（ThermoFisher scientific社製）を用いて64通りのPCRを実施し、2次ライブラリーを作成した。
- ⑥ ダイレクトシーケンス：アガロースゲル電気泳動により、150bp以上の増幅産物を切り出し、MonoFasを用いて精製し、ダイレクトシーケンスを行った。得られた塩基配列について、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) BLAST検索を実施し、培養上清中のウイルスを同定した。

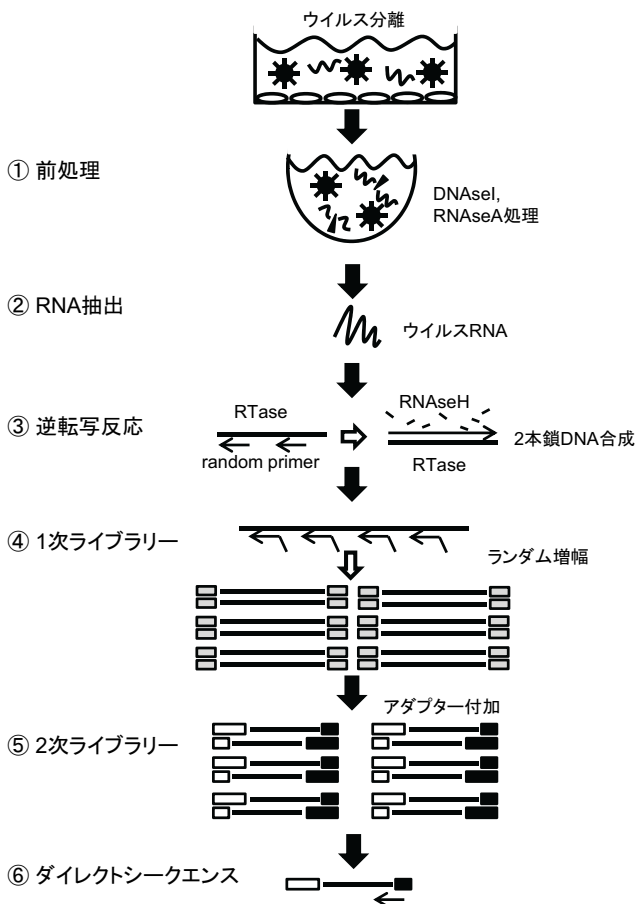


図1 RDV法ver.3.1の概略

2.3 RDV法ver.3.1前処理工程でのヌクレアーゼ処理によるウイルスゲノムへの影響

2.3.1 E9 Hill株のヌクレアーゼ処理

E9 Hill株の培養上清を $10^{-1} \sim 10^{-3}$ まで10倍階段希釈し、試験液とした。2.2①「前処理」の項に従いDNase I及びRNase Aによるヌクレアーゼ処理を実施した。対照試験

液には、ヌクレアーゼの代わりにNuclease Free Waterを用いた。

2.3.2 RNAの抽出

QIAamp Viral RNA mini kit（QIAGEN社製）を用い、検体供与量140 μ Lとなるよう、不足分をPBS（-）で補い、添付マニュアルに従ってヌクレアーゼ処理試験液及び対照試験液からRNA抽出を行った。

2.3.3 逆転写反応

逆転写反応には、Superscript IIIを用いた。RNA抽出液8 μ Lに、pd(N) 6 random hexamer（0.5 μ g/ μ L Takara社製）1 μ L及び10mM dNTPs 1 μ Lを加え、65 $^{\circ}$ Cで5分間加熱後ただちに氷中に移して急冷した。次に5x RT buffer 2.4 μ L、0.1M DTT 1 μ L、Recombinant RNase Inhibitor（40U/ μ L Takara社製）1 μ L、nuclease free water 4.6 μ L及びSuperScript III 1 μ Lを加えて20 μ Lとし、25 $^{\circ}$ C 10分間、50 $^{\circ}$ C 60分間及び98 $^{\circ}$ C 5分間反応させ、cDNAを合成した。

2.3.4 real-timePCR法によるE9 Hill株遺伝子の定量

各試験液から得られたcDNAは、以前我々が開発したE9 Hill株に対するreal-timePCR法^{8) 9)}を用いて定量した。

2.4 RNA抽出工程におけるキャリアRNA添加によるウイルスゲノム検出率への影響

2.4.1 試験液の調製とヌクレアーゼ処理

E9 Hill株の培養上清をreal-timePCR法を用いて定量し、 $10^8 \sim 10^1$ copies/88 μ Lとなるよう10倍階段希釈した。次に、2.2①「前処理」の項に従ってそれぞれをヌクレアーゼ処理し、試験液とした。

2.4.2 ウイルスゲノムRNAの抽出

Agilent Total RNA isolation mini kitについては、添付マニュアルに従い、試験液からウイルスゲノムRNAをnuclease free water 20 μ Lに抽出した。また、キャリアRNA添加試験として、マニュアル中の「Mini prefiltrationカラムを通過させた後の浄化ホモジネート」に対し、各試験液あたり20 μ gのPolyadenylic acid（Sigma Aldrich社製）をキャリアRNAとして添加し、他はマニュアルに従ってウイルスゲノムRNAをnuclease free water 20 μ Lに抽出した。

QIAamp Viral RNA mini kitについては、検体供与量140 μ Lとなるよう、不足分をPBS（-）で補い、添付マニュアルに従い、付属のキャリアRNAを添加してウイルスゲノムRNAをnuclease free water 60 μ Lに抽出した。

2.4.3 real-timePCR法によるE9 Hill株遺伝子の検出及び

定量

2.3.3に従い、逆転写反応を行った後、各試験液あたり3wellずつreal-timePCR法を実施し、E9 Hill株遺伝子の検出を試みた。また、 $10^5 \sim 10^3$ copies/88 μ Lの試験液については定量を行い、試験液あたりのウイルスゲノム量を次式で換算した。

Agilent Total RNA isolation mini kit：ウイルスゲノム量 = 定量値 x $10 \times 20/8$

QIAamp Viral RNA mini kit：ウイルスゲノム量 = 定量値 x $10 \times 60/8$

2.5 RDV法ver.3.1の条件検討

2.5.1 QIAamp Viral RNA mini kitによるウイルスゲノム抽出（検討No.1）

ウイルスA及びウイルスBを用い、RDV法ver.3.1を次のとおり変更して実施した。2.2のうち、②「RNA抽出」の項を変更し、QIAamp Viral RNA mini kitを用い、検体供与量140 μ Lとなるよう不足分をPBS (-) で補い、付属のキャリアRNAを添加し、ウイルスゲノムRNAをnuclease free water 60 μ Lに抽出した。

2.5.2 マイコプラズマの排除法の検討（検討No.2）

ウイルスBを15,000rpm 20分間遠心処理した上清を用い、2.2のうち、②「RNA抽出」の項を次のとおり変更してRDV法ver.3.1を実施した。

②RNA抽出及びDNase I処理：QIAamp Viral RNA mini kitを用い、検体供与量140 μ Lとなるよう、不足分をPBS (-) で補い、付属のキャリアRNAを添加し、ウイルスゲノムRNAをRT buffer 60 μ Lに抽出した後、Recombinant RNase Inhibitor 1 μ L及びDNase I 1 μ Lを加えて37 $^{\circ}$ Cで60分間、次いで75 $^{\circ}$ Cで5分間処理した。

また、対照として、ウイルスBを同様に遠心処理した上清を用い、2.4.2に従ってAgilent Total RNA isolation mini kitにキャリアRNAを添加して抽出したウイルスゲノムRNAについてもRDV法ver.3.1を実施した。

3 結果

3.1 RDV法ver.3.1（原法）による未同定ウイルスの同定

未同定のウイルスA及びウイルスBについて、RDV法ver.3.1（原法）を実施した。対照ウイルスとしてE9 Hill株を用いた。その結果、E9 Hill株については切り出しを行った2次ライブラリー14件のうち7件からE9 Hill株の塩基配列が確認されたが、ウイルスA及びウイルスBについては、いずれも2次ライブラリーに増幅産物が全く確認で

きなかった（データは示さない。）。

3.2 RDV法ver.3.1前処理工程でのヌクレアーゼ処理によるウイルスゲノムへの影響

RDV法ver.3.1（原法）では、RNA抽出工程の際のウイルス粒子溶解時に、前処理工程でウイルス培養上清に加えたヌクレアーゼの失活も同時に行われる。しかし、Miyoshiらは、ふん便検体においてはヌクレアーゼ処理を行わない方がノロウイルスゲノムの検出率が高いことを報告している¹⁰。このことから、RDV法ver.3.1（原法）でウイルスA及びウイルスBが検出できなかった一因がヌクレアーゼ処理にあった可能性が考えられた。そこで、 $10^{-1} \sim 10^{-3}$ まで10倍階段希釈したE9 Hill株を用い、ヌクレアーゼ処理の有無で抽出されるウイルスゲノム量に差が生じるか、real-timePCR法によって検証した。その結果、 $10^{-1} \sim 10^{-3}$ のいずれの希釈においても、ヌクレアーゼ処理によるウイルスゲノム量の低下はみられなかった（図2）。

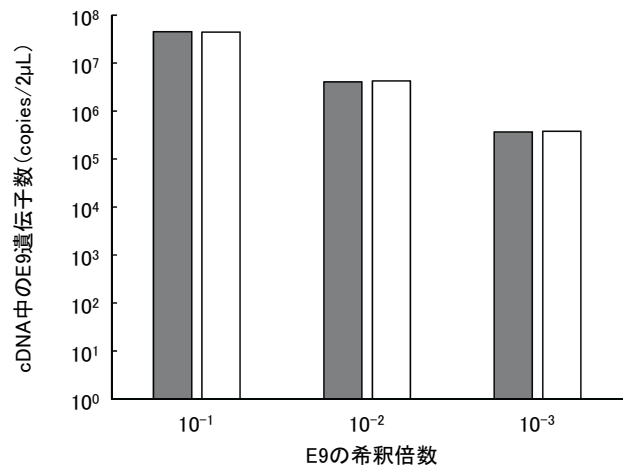


図2 E9培養上清のヌクレアーゼ処理によるE9遺伝子への影響

■ ヌクレアーゼ処理なし □ ヌクレアーゼ処理あり

3.3 RNA抽出工程におけるキャリアRNA添加によるウイルスゲノム検出率への影響

通常、カオトロピック効果を利用したカラム抽出キットを用いて微量のウイルスゲノムRNAを抽出する場合、担体としてキャリアRNAが用いられる。しかし、RDV法ver.3.1原法で使用するAgilent Total RNA isolation mini kitは、細胞、バクテリア等に多量に含まれるRNAを高純度で得ることを目的としたキットであるため、キャリアRNAの使用は想定されていない。そのため、ウイルスゲノムが低濃度であった場合、回収できない可能性が考えられた。そこで、RNA抽出工程におけるキャリア

表2 RNA抽出時におけるキャリアRNA添加によるE9遺伝子検出率への影響

RNA抽出キット ^{*1}	キャリアRNA	E9(copies/reaction)							
		10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
Agilent	無	3/3 ^{*2}	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	添加	ND ^{*3}	ND	ND	3/3	3/3	3/3	1/3	0/3
QIAGEN	添加	ND	ND	ND	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3

検出限界の結果を太字で示した。

* 1 QIAGEN : QIAamp Viral RNA mini kit , Agilent : Agilent Total RNA Isolation Mini kit

* 2 検出数/試験数

* 3 Not Done

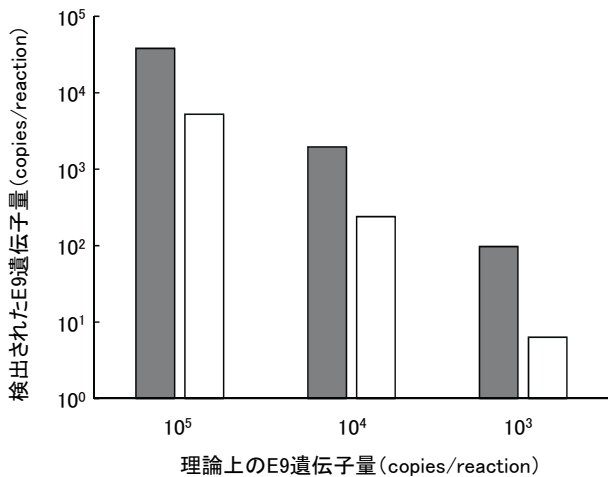


図3 キャリアRNA添加時における各社キットによる抽出効率の違い

- QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN)
- Total RNA Isolation Mini kit (Agilent)

RNA添加の有無によるウイルスゲノム抽出効率への影響について、10⁸ ~ 10¹copies/88μLに調製したE9 Hill株を用いて検証した。その結果、キャリアRNAを添加した場合は10²copies/88μLまで検出できたのに対し、非添加の場合は10⁶copies/88μLまでしか検出できなかった。また、微量のウイルスゲノムを検出することを目的としたQIAamp Viral RNA mini kitを用い、キャリアRNAを添加して同様の実験を行ったところ、Agilent Total RNA isolation mini kitと同様に10²copies/88μLまで検出できた(表2)。

そこで、10⁵ ~ 10³copies/88μLの試験液について、実際に検出されたウイルスゲノム量を両キットで比較したところ、いずれの試験液においてもQIAamp Viral RNA mini kitを用いた場合の検出遺伝子量が大きく、薄くなるほど差が広がることが確認された(図3)。特に、検出限界である10³copies/88μLでの両キットの値の差は大きく、約10倍もあった。

3.4 RDV法ver.3.1の条件検討

3.4.1 QIAamp Viral RNA mini kitによるウイルスゲノム抽出(検討No.1)

これまでに得られた結果から、RNA抽出キットをQIAamp Viral RNA mini kitに変更することでRDV法ver.3.1の検出感度が改善すると考えられたため、ウイルスA及びウイルスBに適用して同定を試みた。その結果、Aウイルスについては切り出した2次ライブラリー9件のうち7件でパラインフルエンザウイルス3型の塩基配列が確認された。しかし、ウイルスBについては、切り出した2次ライブラリー23件のうち9件がマイコプラズマゲノムであり、ウイルスゲノムは含まれていなかった(表3, 4)。

3.4.2 マイコプラズマの排除法の検討(検討No.2)

ウイルスBについては、培養上清中に存在すると考えられるマイコプラズマの除去を目的として15,000rpmで20分間遠心処理し、その上清をQIAamp Viral RNA mini kitを用いたRDV法ver.3.1に供した。対照として、キャリアRNAを添加したAgilent Total RNA isolation mini kitでも実施した。QIAamp Viral RNA mini kitについては、Agilent Total RNA isolation mini kitでは利用できる混入DNAの除去カラムが無いため、抽出RNA溶液をDNase Iで処理することによりRNA純度を高める工程を加えた。その結果、QIAamp Viral RNA mini kitでは切り出しを行った2次ライブラリー8件のうち1件から、Agilent Total RNA isolation mini kitでは9件のうち1件から、それぞれヒトメタニューモウイルスのゲノムを検出した(表3, 4)。また、マイコプラズマについては両キットとも検出されなかった。

4 考察

RDV法ver.3.1のRNAウイルスの検出感度は、おおむ

表3 検出されたウイルス遺伝子断片のBLAST検索結果

検体	検討No.	RNA抽出キット	*1 検出ウイルスゲノムの塩基長 (nt)	BLAST検索結果(株名)	*2 Accession No.	位置	相同性(%)
ウイルスA	1	QIAGEN	91	パラインフルエンザウイルス3型 (SC332)	KY369870	1262-1352	100
			58	パラインフルエンザウイルス3型 (SC332)	KY369870	3129-3186	100
			123	パラインフルエンザウイルス3型 (SC332)	KY369870	637-759	100
			96	パラインフルエンザウイルス3型 (IWA32_2013)	LC076630	522-427	100
			167	パラインフルエンザウイルス3型 (SC332)	KY369870	700-534	100
			118	パラインフルエンザウイルス3型 (SC332)	KY369870	1292-1175	99
ウイルスB	2	Agilent	103	ヒトメタニューモウイルス (HMPVgz01)	GQ153651	3146-3044	100
		QIAGEN	153	ヒトメタニューモウイルス (HR2152-12)	KU375605	149-153	97

* 1 QIAGEN : QIAamp Viral RNA mini kit , Agilent : Agilent Total RNA Isolation Mini kit

* 2 BLAST検索の結果、最も相同性が高い株を示した

表4 RDV法ver3.1における条件検討結果

検体	検討No.	条件				ウイルスゲノムの検出率	ウイルス種
		培養上清の遠心処理	RNA抽出キット	*1 キャリアRNA	RNA抽出後のDNaseI処理		
ウイルスA	原法	無	Agilent	無	無	0/0	—
	1	無	QIAGEN	有	有	7/9	パラインフルエンザウイルス3型
ウイルスB	原法	無	Agilent	無	無	0/0	—
	1	無	QIAGEN	有	無	0/23	—
	2	有	Agilent	有	無	1/9	ヒトメタニューモウイルス
	2	有	QIAGEN	有	有	1/8	ヒトメタニューモウイルス

* 1 QIAGEN : QIAamp Viral RNA mini kit , Agilent : Agilent Total RNA Isolation Mini kit

* 2 検出されたウイルスゲノム断片の数 / シークエンスに供した遺伝子断片の数

ね10³copies/reactionであり、また1,000塩基未満のRNAを増幅することは困難とされている。感度を10³copies/reactionに改善したRDV法ver4.0がYamatoらによって報告されているが、RDV法ver.3.1と比較すると試薬が高価で長時間を要するという欠点がある⁴⁾。そこで今回我々は、RDV法ver.3.1を導入し、検出感度の改善法について検討した。

はじめに、RDV法ver.3.1の原法で、未同定ウイルスであるウイルスA及びウイルスBの同定を試みたが、ウイルスゲノムは検出できなかった。前処理工程のヌクレアーゼ処理によってウイルスゲノムが分解されている可能性を考え、E9 Hill株を用いて検証したが、否定された(図2)。これは、ふん便検体を用いてRDV法ver.3.1を実施したMiyoshiらの報告¹⁰⁾とは異なる結果だが、Miyoshiらの用いたRNase Aは、我々と比較して高濃度であったため、核酸溶出液によってRNase Aが失活するまでのわずかな時間に、むき出しになったウイルスゲノムが分解された可能性があると考えられた。

次に、RNA抽出工程におけるキャリアRNA添加の有無によるウイルスゲノム抽出効率への影響について、E9

Hill株を用いて検証した。その結果、Agilent Total RNA isolation mini kitを用いた場合、キャリアRNAを添加することによって抽出効率が4オーダー程度上昇することが明らかとなった(表2)。一方、QIAamp Viral RNA mini kitにキャリアRNAを添加した場合、抽出されたウイルスゲノムの検出限界はキャリアRNAを添加したAgilent Total RNA isolation mini kitと同様であったが、その定量値は10倍程度高かった。これらのことから、RNA抽出工程でのキャリアRNAの添加はウイルスゲノムの抽出効率に大きく影響し、RDV法ver.3.1にQIAamp Viral RNA mini kitを用いることで検出感度が改善すると考えられた(図3)。一般に、カオトロピック効果を利用したウイルスゲノムRNA検出キットでは、凝集した核酸のシリカへの結合効率を上げるため、キャリアRNAが用いられるが、今回の結果では予想以上の効果が認められた。これは、RDV法ver.3.1においては、抽出するウイルスゲノムの純度を高めるために、雑多な核酸を含むウイルス培養上清へのヌクレアーゼ処理を実施するが、結果的にRNA抽出カラムへ供する長鎖核酸量が減少し、ウイルスゲノムの抽出効率を低下させているものと考えられた。そこで、

QIAamp Viral RNA mini kitを用い、キャリアRNAを添加してRDV法ver.3.1を実施したところ、原法では増幅できなかった2次ライブラリーが得られ、ウイルスAについてはパラインフルエンザ3の塩基配列が確認された。しかし、ウイルスBについては切り出した2次ライブラリー23件のうち9件がマイコプラズマゲノムであり、ウイルスゲノムは含まれていなかった(表3, 4)。

多くの株化細胞がマイコプラズマの汚染を受けており、ウイルスの培養に用いることは望ましくないとされている⁷⁾。今回の結果から、当所で保有するVeroE6細胞がマイコプラズマに汚染されていることが明らかになった。ウイルスBからマイコプラズマゲノムが多数検出された理由として、マイコプラズマは微小であり、ウイルス培養液からVeroE6細胞を除去するために行った粗遠心処理では除去できなかった可能性が考えられた。また、ウイルスAからはマイコプラズマゲノムがほとんど検出されていないことから、RDV法ver.3.1では、培養上清中のウイルス濃度が低い場合に、上清中に存在するマイコプラズマゲノムが強く増幅されるものと考えられた。そこで、ウイルスBについて、マイコプラズマの除去を目的として前処理工程の前に遠心処理を実施した。さらに、キャリアRNAを添加したQIAamp Viral RNA mini kitによるRNA抽出工程の後にDNase I処理工程を加えてRDV法ver.3.1を実施したところ、マイコプラズマゲノムは検出されず、ヒトメタニューモウイルスのゲノムを1件検出した。このことから、前処理工程の前の遠心処理工程及びRNA抽出工程の後のDNase I処理工程は、RDV法ver.3.1の感度改善に一定の効果があると考えられた。但し、遠心処理については、サイズや密度の大きいウイルスの場合はマイコプラズマと共に沈殿してしまい、逆に感度が低下する可能性もあるので、適用は慎重に行うべきだろう。

発生動向調査において、株化細胞によって分離されるウイルスの中には、まれに同定不能なものが含まれる。その多くが新種ではなく既知のウイルスであると思われるが、同定不能に陥る要因として、一般的にはウイルスの変異によるプライマーのミスマッチ、経験不足による同定法の選択ミス等が考えられる。今回我々がRDV法ver.3.1を用いて同定したパラインフルエンザウイルス及びヒトメタニューモウイルスについては、新たに導入したVeroE6細胞で分離したため、細胞変性効果による種の予測ができなかったものである。RDV法ver.3.1は、遺伝子組換え技術を使用せず、特別な機器も使用しないため、このような場合には非常に強力な同定法となる。しか

し、地方衛生研究所で日常的に実施されている様々な検査法と比較すると操作が煩雑であるため、導入は進んでいない。今回、多くの地方衛生研究所で使用されているQIAamp Viral RNA mini kitを用いてRDV法ver.3.1の感度を改善することができたのは大きな成果であった。今後は、臨床検体等にも検索対象を広げ、発生動向調査の疫学解析の一助としたい。

文 献

- 1) Mizutani, T., Endoh, D., Okamoto, M., Shirato, K., Shimizu, H. *et al.* : Rapid Genome Sequencing of RNA Viruses, *Emerging Infectious Diseases*, 13 (2), 322-324, 2007
- 2) Sakai, K., Mizutani, T., Fukushi, S., Saijo, M., Endoh, D. *et al.* : An improved procedure for rapid determination of viral RNA sequences for avian RNA virus, *Archives of Virology*, 152, 1763-1765, 2007
- 3) Watanabe, S., Mizutani, T., Sakai, K., Kato, K., Tohya, Y. *et al.* : Ligation-mediated amplification for effective rapid determination of viral RNA sequences (RDV), *Journal of Clinical Virology*, 43, 56-59, 2008
- 4) Yamato, T., Eshita, Y., Kihara, Y., Sato, T., Kuroda, M. *et al.* : Novel virus discovery from field-collected mosquito larvae using an improved system for rapid determination of viral RNA sequences (RDV ver.4.0), *Archives of Virology*, 154, 153-158, 2009
- 5) Watanabe, S., Maeda, K., Suzuki, K., Ueda, N., Iha, K. *et al.* : Novel Betaherpesvirus in Bats, *Emerging Infectious Diseases*, 16 (6), 986-988, 2010
- 6) Maeda, K., Terakawa, J., Kiso, Y., Nakaichi, M., Endoh, D. *et al.* : Isolation of a novel adenovirus from a fruit bat (*Pteropus dasymallus yaeyamae*), *Emerging Infectious Diseases*, 14, 347-349, 2008
- 7) 田代真人, 牛島廣治編集: ウイルス感染症の検査・診断スタンダード: 羊土社, 294-300, 2011
- 8) 木田浩司, 濱野雅子, 葛谷光隆, 藤井理津志: ノロウイルス検査における抽出コントロールとしてのエコーウイルス9型Hill株のReal-time RT-PCR法による検出, 岡山県環境保健センター年報 34, 73-76, 2010
- 9) 木田浩司, 溝口嘉範, 濱野雅子, 葛谷光隆, 藤井理津志: ノロウイルス検査におけるエコーウイルス9型Hill株を用いた核酸検出効率の評価, 岡山県環境保

健センター年報 38, 107-110, 2013

- 10) Miyoshi, M., Yoshizumi, S., Ishida, S., Komagome, R., Nagano, H. *et al.* : Usefulness of the rapid determination system of viral genome sequences in human stool specimens, *Journal of Virological Methods*, 179, 256-260, 2012